

Liposome-Glycoprotein Iba $\alpha$  粒子の微小循環における挙動解析と生体適合性  
分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

研究要旨 血小板膜上に発現する接着分子であるGPIbaは微小血管において血小板が内皮細胞近傍を通過するために必要なメカニズムを担っていることがラット微小循環における生体内解析で明らかになった。ヒト GPIba と交叉反応性を示すラットの微小循環系はヒト組み換え型GPIbaを表出させたりポソーム粒子(Lipo-GPIb)の挙動を解析するのに最適な系であることが示された。Rhodamine 蛍光標識した Lipo-GPIbは血管内投与すると未刺激の健常微小血管と一過性の接着反応を示すが血小板凝集や内皮への接着を示さなかった。また流血中の白血球挙動にも大きな変動をもたらさなかった。GPIbの表出は人工粒子を流体下で確実に血管壁近傍に偏在させるための重要な戦略であると考えられた。

## A 研究目的

人工素材から成る vehicle の表面にヒト組み換え型の接着分子を表出させてその生体内機能評価を行う系を確立することは人工血小板の実用化に必須のプロセスである。本研究では GPIba を表出させたりポソームがそのような candidate として作成されてきた。昨年度までの本研究によりヒト組み換え型 GPIb がラットの vWF や P-selectin と結合し交叉反応性を持つことが示されヒト GPIb の機能を生体内解析するためにラット微小循環が格好のシステムであることが示された(1)。今年度の本研究では人工血小板粒子の candidate であるヒト組み替え型 GPIb $\alpha$ -liposome (Lipo-GPIb)をラットの血管内に投与しその挙動を解析した。

## B 研究方法

### 1 蛍光標識 GPIb $\alpha$ -coated liposome (Lipo-GPIb)の調整

Nishiyaらの既報の方法に従い(2)ヒト組み替え型GPIb $\alpha$ を径約250nmのリポソーム粒子表面に表出させ、rhodamineによる蛍光標識を行った。リポソーム粒子は濃度 $1 \times 10^{11}$ 個/mlに調整した。

コントロールとしてGPIb分子を表出させていないリポソーム粒子、および Gain-of-function mutant である M239V GPIb $\alpha$ を同条件で表出させた蛍光標識リポソーム粒子も作成した。Wild-type GPIba を有する血小板は必ずり応力依存性の血小板凝集を示すがM239V mutantは必ずり応力に関係なく血小板凝集が亢進することが知られている(3)。したがって両者の生体内挙動を知ることにより lipo-GPIb の血管壁との相互作用のメカニズムにおける必ずり応力依存性の関与を検討できると考えた。

### 2 微小血小板粒子の超高速高感度ビデオ観察法

既報の方法を用いて(4)(5)、Wistar系雄性ラット(300g)腸間膜微小循環において蛍光標識リポソーム粒子の生体内撮像を試みた。これらの解析には通常ビデオ記録速度(30 frame/sec)ではあるものの検出感度の高い撮像法である Silicon intensified target (SIT) cameraを用い、Gain 8, offset 2の条件を固定して微小血管の撮像を行った。観察は20-30ミクロン径の細動脈、細静脈を任意に選択し

て、蛍光標識粒子の挙動をSVHS video recorderに記録した。リポソーム粒子は $2 \times 10^{10}$  個/ratを1分かけて大腿静脈カテーテルから投与を行い、投与前および投与後1分、5分、10分以降10分ごとに40分までビデオ画像を各2分間記録した。この記録時間の間、観察領域を励起波長530 nmでepi-illuminationを行い画像を取得し、観察のインターバルには照射を止めて組織の障害を最小限にする工夫を行った。

一方リポソーム粒子の血管内皮細胞への接着メカニズムを詳細に検討する目的で抗ヒトGPIb $\alpha$ 単クローン抗体を用いた阻害実験を行った。使用した抗体はGPIbとvWFの接着を阻害する抗体GUR83/35と、結合による阻害を示さないWGA3の2種類であり、慶應義塾大学医学部輸血センター半田 誠博士より供与された。これらの抗体は、リポソーム標品にex vivoであらかじめ25  $\mu$ g/mlで10分間incubateし、体内投与に供した。

### 3 ビデオ解析によるLipo-GPIbの微小循環における挙動解析法

流血中に投与した蛍光標識粒子は血液とともに流れるためそれ単独では強い蛍光を生じないが、複数が凝集して血管壁に一過性に接着することにより強い蛍光を生じると考えられる。この際粒子数の増大により蛍光強度は増加すると考えられる。したがって微小血管壁近傍に蛍光強度測定用のウインドウ( $2 \times 2 \mu^2$ )を設置し、観察した血管のビデオ画像をランダムに選定して微小凝集粒子の蛍光強度を8 bitのグレイレベルとして表現し計測を行った。画像解析ソフトとしてIP-Lab/NIH Image 1.63を使用し、ビデオ画像は10秒ごとに10フレームを静止画像として取得したのち、血管内皮細胞の内腔側にウインドウを設定して血管の長軸方向に移動させてランダムに40箇所/1画面でグレイレベルを測定した。この測定により凝集塊のない血管内腔には遊離リポソームの存在による弱い蛍光が測定され、凝集塊の存在部位では強い蛍光が測定されることになる。このような測定データ

を各群5-7匹のラットを用いた実験から集積し、ヒストグラム解析により比較検討した。

### C 実験結果

図1に蛍光標識Lipo-GPIbの細動脈における凝集塊形成のヒストグラム解析結果を示した。観察した細動脈のwall shear rateは800-1600sec<sup>-1</sup>の幅を有したが各群で有意な差を認めなかった。データはリポソーム粒子投与20分後の成績を示す。コントロールのリポソーム粒子は微小血管内腔をほぼ均一に分布し、図1の左上に示すように平均のグレイレベルが80前後を示すほぼ一峰性の分布であり120以上の強度を示す領域は認めなかった。これに対してLipo-GPIb (Ib-alpha-liposome)を投与した群では血管内腔の染色を認めるものの大部分は明るい小粒子塊を形成して血管内にheterogeneousに分布した(図1右上)。粒子の明るさにも著明な不均一性が存在し、グレイレベルは最高で200にも及んだ。同様の条件でLipo-GPIbにex vivoでモノクローナル抗体GUR83-35をあらかじめ結合させた標品では明るい粒子の頻度が著明に減少し、ヒストグラムの形状はコントロールのそれに近づいた(中段左)。一方GPIbに結合するもののその接着性を阻害しない抗体であるWGA3の処理群では抗体処理をしないLipo-GPIb粒子と同様のヒストグラムを呈した。また下段に示すようにラットvWFと交叉反応性を示す抗体AJvW2の投与(1.5 mg/kg iv)でも粒子の凝集形成が著明に抑制された。このようなLipo-GPIb粒子の血管内皮細胞への接着は基本的に一過性であり、1秒を超えて接着する粒子の頻度はまれであった。

このようなLipo-GPIb粒子の一過性接着はshear rateが500-600程度の細静脈でも認められ、不均一な蛍光強度を持つ粒子の接着として認識できたが、その一部は内皮細胞上をrollingする白血球と一塊を形成して流れていることが明らかとなった。したがってその挙動

はrollingする白血球のない細動脈とは様相を異とし、血管内皮と接着したのち白血球に巻き込まれて下流に流れるものやはじめから白血球に接着した状態でrollingするものなどの多様性が認められたため、細動脈側で行ったような解析が困難であった。しかしこれらの所見は体内に投与された Lipo-GPIb の少なくとも一部が白血球表面に接着することを示した。一方Gain-of-function mutantであるM239V GPIb-liposomeを投与すると投与直後から多数の粒子が細動脈壁に一過性の接着反応を示すが10分以内にrecirculationを示す粒子の数が著明に減少した。図2に一過性接着を示した粒子の出現頻度を、wild type lipo-GPIb 投与一分後の値を100%として示したが、観察時間である40分までの範囲でWild type GPIb-liposomeは20%程度の低下に留まったのに対して、M239V mutant-liposome投与群では最初の1分-5分での接着がwild typeに比べて高値を示したものの、10分以降は著明に低下し、recirculationを示す粒子が減少することが明らかになった。

## D 考察

今年度の実験により体内に投与された血小板粒子が流れのある微小血管壁近傍に効率的に集積するためには表面にGPIb $\alpha$ 分子を表出させることが極めて有効であることが確認された。しかも GPIb 修飾リポソームは流れのある条件下では不均一な小凝集塊を形成して血管内に分布し、正常微小血管では一過性の接着は示すもののstationaryな接着反応を呈さないことも明らかにされた。このことは本粒子が正常血管壁に不必要な接着反応を呈さない点で優れていることを示している。したがって今後は本粒子を基本構造として通常血管内腔に表出しておらず障害部位でのみ接着性を発揮する分子をさらに付与することで止血効果のある代替物の開発が可能になる期待があると思われる。そのような分子の候補としてはGPIIb/IIIaやfibrinogenなどが挙げられる。

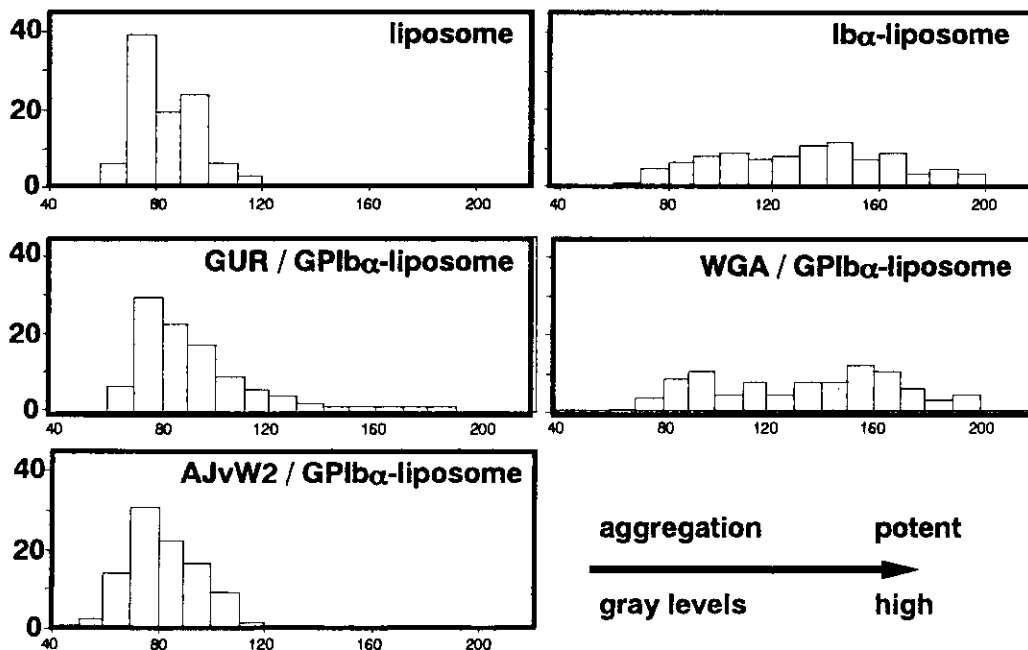
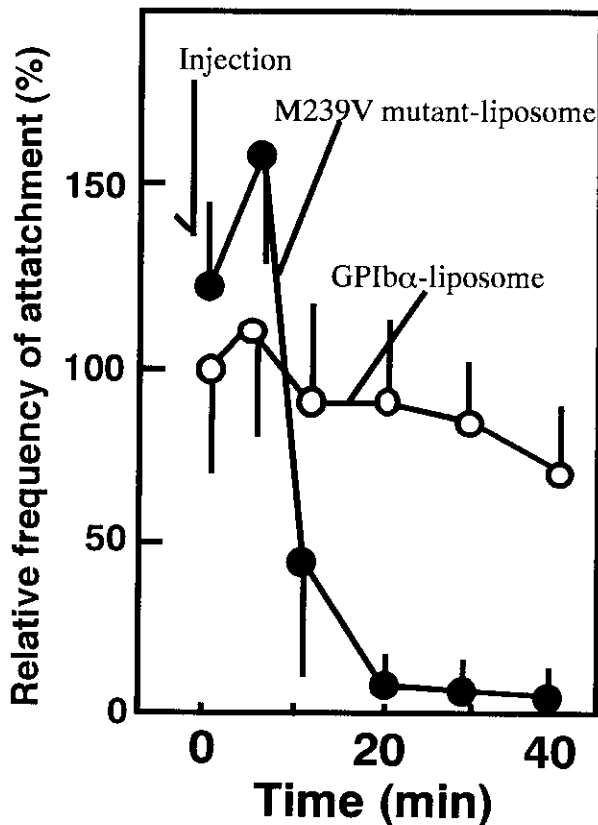


図1 細動脈血管壁に一過性接着を示す Rhodamine 標識 Lipo-GPIb 粒子の蛍光強度の heterogeneity。計測は投与20分後の解析値を示す。GPIb $\alpha$ を持たない liposome 粒子は血管腔全体に diffuse に分布するためグレーレベルは血管内でほぼ均一となる。GUR: GUR83/35 (機能阻害型 MoAb)。WGA: WGA3 non-blocking MoAb。AJvW2: Anti-human vWF MoAb (味の素研究所 山本博士の御好意により供与)

次に Lipo-GPIb は血管内に投与した場合一部は白血球に接着して流血中に分布する可能性が本実験で示された。ヒトにおける人工血小板粒子を投与する症例を考慮した場合本剤を投与した際に白血球の機能を修飾することは好ましくない。すなわち、がん患者では感染症に対する防御能が低下している場合があり、もし GPIb が白血球の接着機転に必要な血漿蛋白を吸着して (e.g. Thrombin)、これを抑制したり、あるいは逆に GPIb-P-selectin 相互作用を介して白血球接着を必要以上に増強するリスクが考えられる。このようリスクの有無を検証するために、ラット腸間膜微小循環における白血球接着モデルを用いて、Lipo-GPIb が刺激惹起性の白血球接着になんらかの影響があるか否かを検討した。図 3 にその成績を示した。ここでは腸間膜上に終濃度 100nM で白血球接着刺激物質として FMLP を表面灌流し、接着反応の時間経過を追跡し、20 分後に Lipo-GPIb を  $2 \times 10^{10}$  個/rat で投与して、その後の接着数をさらに 30 分追跡した。



その結果、本実験条件での Lipo-GPIb の投与は白血球接着動態に有意な変動をもたらさないことが明らかにされた。一方 M239V mutant liposome 投与群では投与直後から白血球接着が著しく阻害されることが示された。このメカニズムは不明であるが、微小血管局所の thrombin などが mutant protein に吸着されて白血球接着に必要な局所の P-selectin などの発現が抑制された可能性を考え検討を進めている。今後粒子の生体内分布を解析する上で、この所見は極めて重要であり、ひきつづき同様の実験を高用量の Lipo-GPIb を用いて検討し、全身レベルでの血小板、白血球数の変化などとリンクさせて解析する必要があると考えられる。

血管内に投与されたりポソームの体内半減期は reticuloendothelial system の貪食能により大きく左右されると考えられる。今年度の研究では前述の実験と並行して微小粒子の肝臓における捕捉を行うと考えられる Kupffer cell の減少ラットの作成を試み、肝臓微小循環における蛍光標識粒子の貪食を画像化し、Kupffer cell 減少状態での捕捉低下の動態を解析することに成功

図 2 蛍光標識リポソーム粒子の細動脈壁への transient attachment の頻度の時間経過。GPIb $\alpha$ -liposome 投与後の attachment の出現頻度を血管の長軸方向 100 $\mu$ m で算定しその平均値を 100 として他のデータを normalize した。M239V mutant GPIb-liposome は投与直後には高い頻度で接着反応を起こすが投与 10 分以内にその頻度は減少し 20 分以降はほとんど観察できなくなる。また有意差はないが wild type の粒子出現頻度は観察時間内で約 25% 減少した。これは liposome 粒子自身が reticuloendothelial system で捕捉されて free circulation を示す粒子の絶対数が低下することが関与する可能性があると思われる。

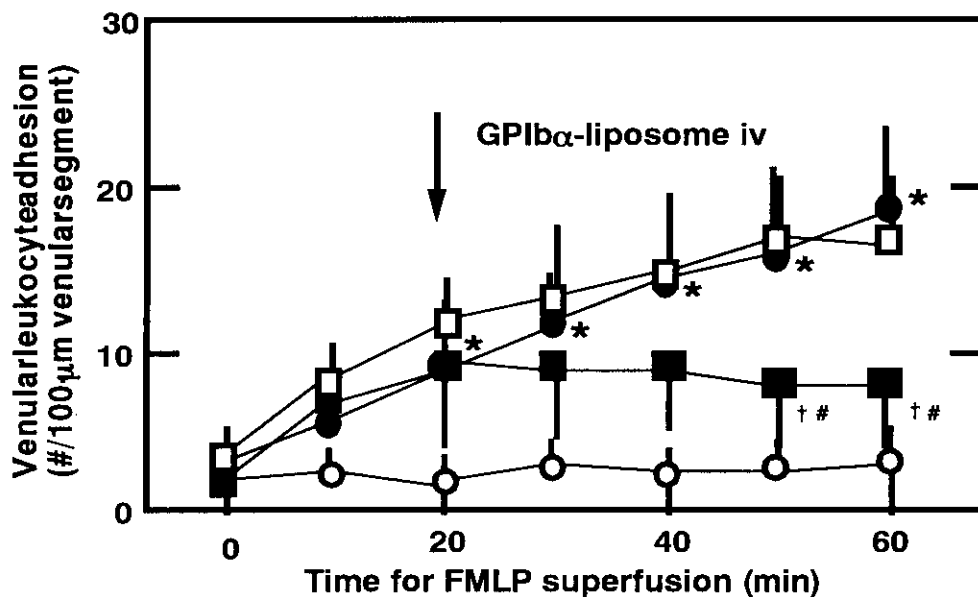
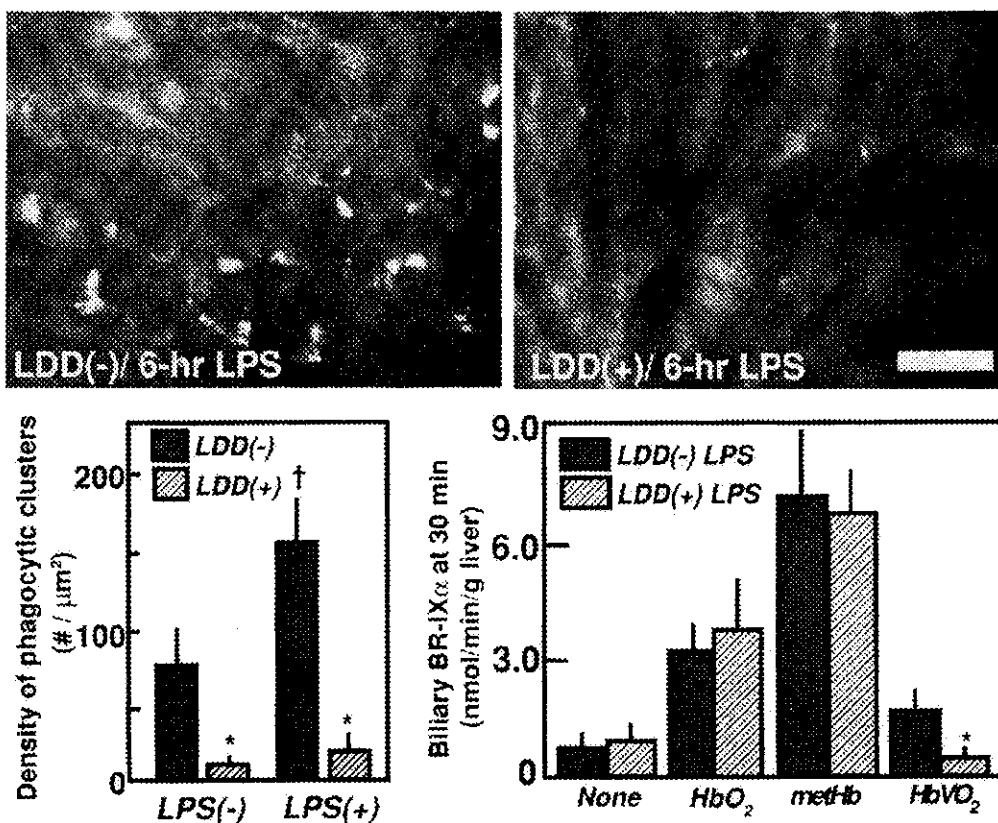


図3 FMLP 惹起性白血球接着反応に対する Lipo-GPIb 投与の効果 (上)。FMLP は 100nM で表面灌流し、20分後に liposome を投与した。白丸: liposome(-)FMLP(-)。黒丸 FMLP 単独。白四角: wild-type GPIb $\alpha$ -liposome。黒四角: M239V mutant GPIb $\alpha$  liposome。

図4 蛍光標識ラテックス粒子を用いた肝臓における Kupffer cell を介した貪食反応の評価 (下)。LDD: liposome dichloromethylene diphosphonate (Kupffer cell-depleting reagent)。LPS 処理した肝臓では cluster 形成が増加するが LDD 処理でほぼ完全に消失する。(文献 6 Figure 4 を引用)



した(図4、文献6,7)。貪食された粒子はクラスターを形成し強い蛍光を発するがこれをlaser confocal microscopyでスキャンしてクラスターの密度を数値化することが可能となった。本実験ではラテックス粒子を用いた生体内撮像を試みているが、同様の解析は蛍光標識リポソームでも可能であることを確認している。文献6でも触れているようにKupffer cellの粒子捕捉能力は正常とサイトカイン血症では大きな相違があり、血小板接着分子のvehicleとしてのliposomeの生体適合性の検討を正常時と病態時で対比させて検討する必要もあるかと思われる。

なおリポソーム製剤を作成していただいた慶應義塾大学医学部内科 西谷孝子先生と抗体供与をしていただいた輸血センターの半田 誠先生に深謝申し上げます。

## F 研究発表など

### (1) 論文発表／関連文献

- 1 Katayama, T., Ikeda, Y., Handa, M., Tamatani, T., Sakamoto, S., Ito, M., Ishimura, Y., Suematsu, M. Immunoneutralization of glycoprotein Ib $\alpha$  attenuates endotoxin-induced rolling of platelets and leukocytes on rat venular endothelium in vivo. *Circ. Res.* In press, 2000.
- 2 Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib $\alpha$  to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270(3):755-60.
- 3 Moriki T, Murata M, Kitaguchi T, Anbo H, Handa M, Watanabe K, Takahashi H, Ikeda Y. Expression and functional characterization of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib $\alpha$  (Met239-Val) reported in patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 1997;90:698-705.

4 Morisaki, H., Katayama, T., Kotake, Y., Ito, M., Ishimura, Y., Takeda, J., Suematsu, M. Roles of carbon monoxide in leukocyte and platelet dynamics in rat mesentery during sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* in press 2001

5 Johnston, B., Burns, A.R., Suematsu, M., Watanabe, K., Issekutz, T.B., Kubes, P. Increased sensitivity to the C-X-C chemokine CINC/gro in a model of chronic inflammation. *Microcirculation* 7, 109-118, 2000.

6 Kyokane, T., Norimizu, S., Tani, H., Naito, M., Takeoka, S., Tsuchida, E., Nimura, Y., Ishimura, Y., Suematsu, M. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 2001;120, 1227-1240

7 Tanimoto, A., Oshio, K., Suematsu, M., Pouliquen, D., Stark, D. Relaxation effects of clustered particles. *J. Magnet. Reson. Imag.* In press 2001

## (2) 関連特許

血小板 GPIb $\alpha$  の機能抑制物質を有効成分とする抗炎症剤

(発明代表者 特願2000-136496)

**研究要旨** 人工血小板  $Ib\alpha$ -liposome,  $Ib\alpha$ - $IaIIa$ -liposome の生体内機能評価をラットを用いて行った。人工血小板は、血小板数の減少が比較的軽度の場合止血効果を示したが、逆に止血効果を阻害する場合もあった。血小板凝集能より、その阻害効果が内在血小板との競合にあることが考えられた。今後の人工血小板開発に、内在血小板との共同した2次凝集進展を促す工夫を必要とすることが示唆された。

#### A. 研究目的

liposome に血小板糖蛋白  $Ib\alpha$ ,  $IaI$  を結合させた人工血小板は、コラーゲン被覆面に結合することが確認されている。しかし生体内で止血効果を示しうるかは未だ明らかでない。我々は実験動物を用いて人工血小板の生体内での機能評価を行った。

#### B. 研究方法

ヒトと血小板糖蛋白に相同性が高いラットを用い、シンプレート出血時間を尾浸水条件で測定する系で実験を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する苦痛を伴う処置を施す際には、ネンプタール麻酔を使用し、屠殺処分が必要な場合には、ネンプタール麻酔施行後ジエチルエーテルを用い苦痛の排除に努めた。

#### C. 研究結果

浸水条件シンプレート条件は、血小板数  $76 \times 10^3/\mu l$  以上において血小板数と出血時間に一次相関関係を示した

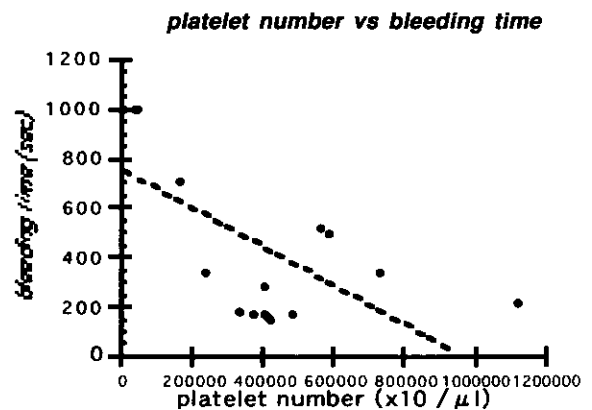
(図1)。

血小板減少ラットに対する  $Ib$ -liposome の輸注は、血小板数  $169 \times 10^3/\mu l$  未満において止血効果が認められなかった。血小板数  $201 \sim 500 \times 10^3/\mu l$  におい

て止血効果が認められなかった。

血小板数  $201 \sim 500 \times 10^3/\mu l$  において出血時間の短縮したもの 3/8, 不変 1/8, 延長 4/8 と出血時間の延長を示すものがあった。

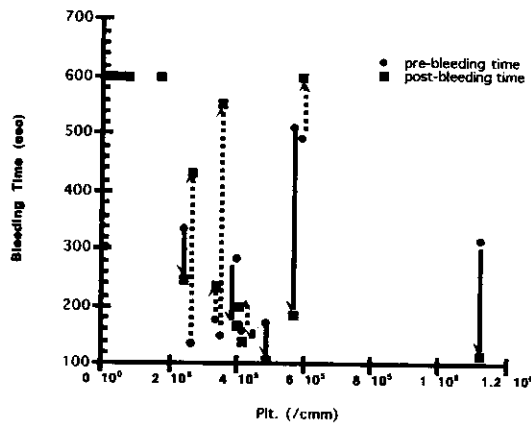
図1



血小板数と出血時間は、 $r=0.73$  で負の相関を示す。

$501 \times 10^3/\mu l$  の血小板数においては、出血時間は、短縮もしくは不変であった(図2)。 $Ib\alpha$ - $IaIIa$ -liposome の輸注を血小板数  $170, 200, 336 \times 10^3/\mu l$  の血小板減少ラットに輸注した場合も出血時間の延長が確認された。

図 2



Ib $\alpha$ -liposome 輸注後の血小板減少ラットにおける出血時間の変化  
血小板数が 210 から 500  $\times 10^3/\mu\text{l}$  において出血時間の延長が認められた。破線は出血時間が延長したものを示す。

#### D. 考察

人工血小板輸注後出血時間の延長が認められた。人工血小板は、障害血管に露呈した vWF(フォン・ヒルブランド因子)、コラーゲンに結合するが、その後フィブリンノーゲンを介した2次凝集へ進展しない。人工血小板が内在する自己血小板と競合し、止血を阻害する可能性が示唆された。我々は、ラットにおいてリステチンを刺激因子とした血小板凝集能測定をおこなった。Ib $\alpha$ -IaIIa-liposome は容量比 25,50% 混合で最大凝集をそれぞれ 19 から 10, 11 から 2% へと大きく減少させた。このことから人工血小板は、障害血管壁の vWF を内在血小板と競合することが示された。

#### E. 結論

今回 Ib-liposome, Ib $\alpha$ -IaIIa-liposome をシンプレート出血時間を浸水条件で測定する系により in vivo 評価

を行ったが、内在血小板との vWF 競合によると考えられる出血時間の延長が一部の条件でみられた。

た。今後止血効果を安定した条件で発現できる血小板を創製するためには、フィブリンノーゲンを固着させる等の、二次凝集につながる機能をもたせる必要があることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

人体への使用を行ったものではなく、健康危険情報について示すものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

平成 13 年度血栓止血学会にて発表予定。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現時点でなし。



人工血小板開発研究の動向調査とその臨床応用に関する研究

分担研究者 池淵研二 北海道赤十字血液センター 副所長  
 研究協力者 池田久實 北海道赤十字血液センター 所長  
 藤原満博, 阿部英樹, 若本志乃舞  
 北海道赤十字血液センター 研究部

研究要旨

開発中のリコンビナントヒト血小板糖蛋白固相化リポソームの血液成分に対する生体適合性について検討した。リポソーム構成脂質としてdipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG)と1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA)の2種類で調製されたリポソームを対象とした。血小板との相互作用の検討では、コラーゲン刺激による血小板からのRANTES放出には影響を認めなかった。また血小板活性化の指標となるp-selectinの発現率においても影響が認められなかった。リポソーム製剤を血清と20%あるいは28%の割合で混合し、補体への影響を検討したところ、コントロールに比べ2-10倍程度のSC5b-9複合体形成が見られた。しかし臨床で輸血によりアナフィラキシーショックが惹起された場合に血中に認められる補体複合体のレベルには達しなかった。血漿と20%、40%、60%の割合で混合し、凝固活性に及ぼす影響を検討したところ、プロトロンビン時間 (PT) は混合率が上昇するにつれ延長する傾向が認められたが、コントロールとして生食を添加した場合の延長程度と差がなかった。活性化部分トロンボプラスチン (APTT) についてもDPEAで調製されたリポソームでは同様であったが、DPPGで調製されたリポソームでは短縮傾向が認められ、凝固を亢進させる可能性が示唆された。

1. リポソームの血小板活性化に対する影響

A. 研究目的

これまで赤血球代替物研究の過程で、リポソーム内包型ヘモグロビンを実験動物に投与した際、血小板の体内分布の変化 (肺への一過性集積)、血小板減少などが惹起される場合が報告されている。血小板の活性化がベースにあると想定されているため、人工血小板の分野でも開発中のリポソーム型製剤の血小板への影響をin vitroで検討することは重要である。

B. 研究方法

40 ml全血 (クエン酸3ナトリウム加) から多血小板血漿 (PRP) を調製した。

1) 血小板からのRANTESの放出

PRP ( $1.6 \times 10^9/ml$ ) とDPEA構成リポソーム (調製の都合で中にヒトヘモグロビンが内包された製剤) を混合し (0%、20%、40%)、37°C、60分間プレインキュベーションした後、コラーゲン (1 µg/ml) または緩衝液を添加し、5分間インキュベーションを行った。反応後上清を採取し、ELISAにてRANTESレベルをアッセイした。

2) p-selectinの発現

PRPとDPEA構成リポソームを混合し (0、20、

40%)、37°C、60分間インキュベーションした後、1%パラホルムアルデヒドで固定し、洗浄した。CD62PE標識抗体あるいはコントロールIgG PE標識抗体で染色し、フローサイトメトリーにてp-selectinの陽性率をアッセイした。

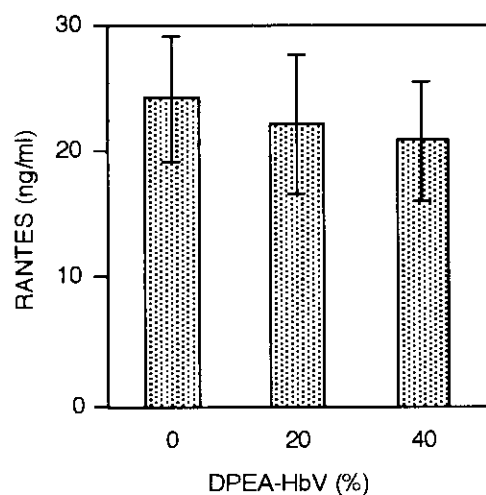


図1. 血小板からのRANTESの放出反応に対するDPEA-HbVの影響。

N = 5, mean ± SE.

表1. 血小板p-selectinの発現率に対するDPEA-HbVの影響.

	DPEA-HbV		
	0%	20%	40%
p-Selectin (%)	1.4 ± 0.6	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1

N = 4, mean ± SD.

### C. 研究結果

コラーゲン刺激による血小板からのRANTES放出をアッセイしたが、DEPA構成リポソームの影響は見られなかった(図1)。

同様にp-selectin発現率への影響も認められなかった(表1)。

### D. 考察

通常の血小板凝集測定装置は透過光の散乱変化をベースに凝集をアッセイするため、リポソーム製剤を数~10%のレベルで添加するアッセイ系には適応できない。そのため活性化が惹起された際、血小板から放出されるケモカイン、RANTESの量、および血小板表面に表出されるp-selectin陽性率を目安に検討した。この2つのマーカーではリポソーム製剤の血小板への適合性には問題がなかった。

今後、実際に実験動物にリポソーム製剤を投与し、動物から回収した血小板に影響が出てこないか否か、検討していきたい。

## 2. 補体活性化についての予備検討

### A. 研究目的

リポソーム製剤(抗ガン剤や抗真菌剤を内包させた製剤など)の臨床応用に際し、補体の活性化とそれに関連するアレルギー、アナフィラキシーなどの副作用が報告されている。ある研究者グループでは、生体には抗コレステロール自然抗体が存在し、リポソーム膜上で抗原・抗体反応が惹起され、補体が活性化され、そのためにリポソーム製剤が網内系に貪食され、ついてはリポソーム製剤の血管内滞留時間が短く制限されると考えている。

人工血小板として開発中の製剤の1つはリポソーム製剤であるため、この点を検討し、副作用がなく、かつ血管内半減期が長い製剤の開発のためのヒントを得ることは重要である。

表2. ヘモグロビン小胞体が補体に及ぼす影響.

Subject Number	SC5b-9 (µg/ml)		
	PBS	DPEA-HbV (20%)	DPPG-HbV (28%)
1	3.4	8.7	7.8
2	2.8	6.9	7.5
3	3.6	6.5	7.7
4	6.9	9.6	8.7
5	6.3	19.7	8.7
6	3.7	18.7	16.9
7	2.0	19.5	16.2
8	1.7	16.7	13.4
Median	3.5	13.2	8.7
Range	1.7-6.9	6.5-19.7	7.5-16.9

### B. 研究方法

補体活性化の指標としてTerminal Complement Complex (TCC)をSC5b-9 (soluble, non-lytic form of TCC)で代表させ、EIA kit (QUIDEL, CA, USA)にてアッセイした。

健常人8名から採取した血清をDPEA構成リポソーム(終濃度20%)、DPPG構成リポソーム(終濃度28%、前者と同じ脂質量となる)、およびPBSと混和し、37°C、1時間インキュベーションした。15,000rpm、4°Cで45分間遠心し、その上清を50、100倍希釈して上記のキットを用いてアッセイした。

### C. 研究結果

DPEAおよびDPPG構成リポソーム添加系でSC5b-9は5~20 µg/ml程度の増加が見られ、コントロールの数µg/mlに比べて4倍程度の増加を認めた(表2)。

### D. 考察

抗コレステロール自然抗体の存在を提唱しているAlvingらの施設からは、リポソーム製剤と血漿の組み合わせで、20~30 µg/mlレベルのSC5b-9増加があることが報告されている。また臨床的にアナフィラキシーショックを呈した症例ではSC5b-9が数10倍から100倍程度一過性に増加することが報告されている。今回アッセイした8例の健常人にお

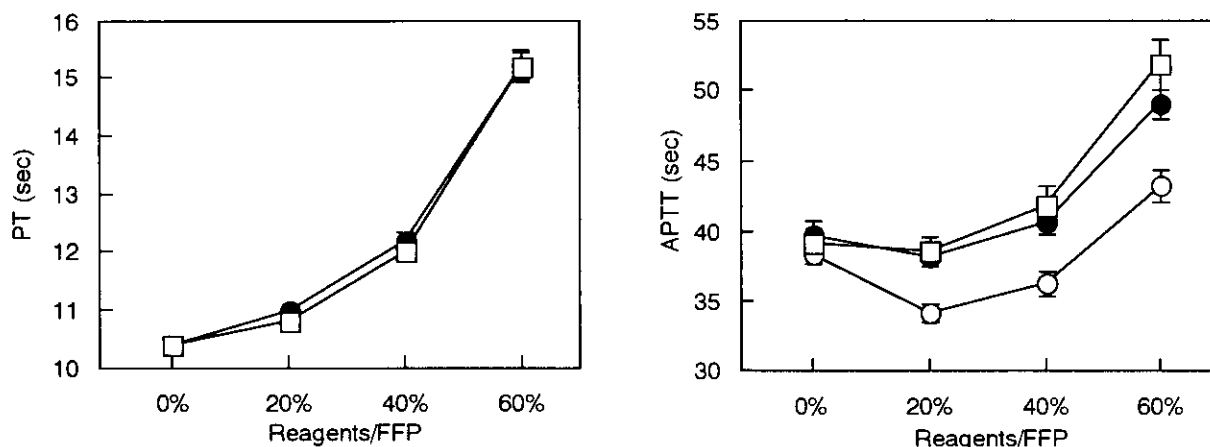


図2. DPPG-HbV及びDPEA-HbVが血漿凝固活性に及ぼす影響。

□: Saline ●: DPEA-HbV ○: DPPG-HbV  
N = 5, mean ± SEM.

ける変化が、実際に臨床的に症状を出すようなレベルに達しているか否かは、さらに文献を検索し、考えて行きたい。

リポソーム製剤投与がin vivoでどのような反応を惹起するかは、動物種、構成脂質種、ステルス化、などに大きく影響を受けるとされている。実験動物で反応が惹起されないから、ヒトでも大丈夫と簡単に言い切れない点、従来から判断が難しい面がある。そのため、ヒト血清あるいは血漿とリポソーム製剤をインキュベーションした際に産生される活性化補体を十分調査しておくことは重要である。

### 3. 凝固系への影響

#### A. 研究目的

リポソーム製剤が止血を目的に大量に投与されると血液の希釈が生じ、凝固因子にも希釈が起こり、凝固が遷延する可能性がある。また生体にとって異物といえるリポソーム製剤が投与され、凝固が活性化されることも危惧される。あらかじめ凝固系への影響を調査しておく。

#### B. 研究方法

血漿とDPPGおよびDPEA構成リポソームを20%、40%、60%に混合し、血液凝固測定装置でPTおよびAPTTを測定した。対象として、生食を用いた。

#### C. 研究結果

PT、APTTともリポソーム製剤の混合比率が上が

るに従い、延長する傾向が認められた(図2)。例外として、DPPGリポソームは混合比率を上げることにより、APTTが短縮される傾向を示した。

#### D. 考察

APTTは内因系凝固機序を反映するマーカーである。内因系凝固のトリガーとして接触相、つまり陰性荷電を帯びた表面との接触が想定されている。輸血臨床における実例として、白血球除去フィルターを用いた血液製剤の濾過過程でのブラジキニン産生が報告されている。

DPPGを構成成分としたリポソームでAPTTの短縮傾向が認められたのは、このリポソームのネット荷電が陰性に偏っている可能性が示唆されるため、特殊な装置を用いて荷電状態を検討したいと考えている。

また今後リポソームを構成する脂質の変更が考えられる場合には、この凝固系に及ぼす影響を予想する良いマーカーになる可能性も示されたと考ええる。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K. Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* (in press).

Abe H, Ikebuchi K, Niwa K, Inanami O, Kuwabara M, Fujihara M, Hirayama J, Ikeda H. Superoxide generation from human polymorphonuclear leukocytes

by liposome-encapsulated hemoglobin. *Artif Cells  
Blood Substit Immobil Biotechnol* (submitted).

## 2. 学会発表

第7回 日本血液代替物学会 9月7-8日, 札幌

・藤原収子, 他. リポソームがヒト末梢血白血球  
に及ぼす影響-TNF- $\alpha$ の産生とSOD内包化による  
抑制効果-

・池淵研二, 他. 血液事業の立場から.

細胞近傍の微小流動及び微粒子運動の計測と解析

分担研究者 谷下 一夫 慶応義塾大学理工学部教授

**研究要旨** 人工血小板の止血能を評価するため、粒子の流動分布と粘着能を測定した。流動分布には粒子の変形性が大きな影響を与えるため、粒子の弾性係数の測定を行った。人工血小板としては、GPIa/IIa を被覆したアルブミン微粒子（rGPIa/IIa-AMS）を用いた。粒子の弾性係数と粘着力は原子間顕微鏡によって測定した。流動分布を昨年度までに開発された測定系によって測定したところ、AMS の流動分布のピーク値が壁に近寄る傾向があり、壁での凝集を促進する効果が見られた。人工血小板の粘着力は血小板の52%であったが、血小板にはcollagen のレセプターとしてGPIa/IIa 以外にもGPIV やGPVI 等があるので、血小板の方が人工血小板に比べて粘着力が高いと解釈できる。実際の止血効果を生む出すための最適な粘着力の大きさに関しては、さらに総合的な評価が必要であるが、固相化するrGPIa/IIa の量の調節により粘着力を高める事が可能である。

**A. 研究目的**

in vivo の系では様々な要素が絡み合っており、血小板の粘着及び凝集が起こるので、本研究においてはin vitro の系で人工血小板の評価を行うために血小板止血機能が重要な細動脈（径15-500 $\mu$ m）をモデルとした一辺200 $\mu$ m の矩形管流路を用いた。また人工血小板プロトタイプには早稲田大学理工学部の武岡らが作製したrGPIa/IIa-AMSを用いた。これはアルブミンマイクロスフィア（AMS）に recombinant GPIa/IIa（rGPIa/IIa：血小板膜上の粘着に関わる糖蛋白を遺伝子組換えにより精製したもの）を固相化したものである。

Aarts らは血小板だけを懸濁させた場合、血小板は壁近傍には寄らず、さらに赤血球を懸濁させると血小板は壁近傍に寄ることを報告した。これは血小板の止血機能、すなわち血管損傷部位への粘着および凝集機能を促進するものであり、輸注される人工血小板も同様の挙動を示すことが期待される。現在、このプロトタイプの挙動そのものは分かっていない。その止血機能を評価するには流動中の挙動、特に壁面との相互作用を観察する必要がある。また、赤血球は血小板を壁近傍に分布させるという重要な働きをすることが推測されるので、赤血球ゴーストを調製し、灌流液に懸濁させた。最終的に灌流液には人工血小板、赤血球ゴーストを懸濁させ、人工血小板の挙動（人工血小板の流動分布）を追い、評価を行う。

Goldsmith が報告したところによると、液滴はレイノルズ数に関係なく管軸に移動し、剛体粒子は

低レイノルズ数（ $Re \ll 1$ ）の時は管壁に寄り、高レイノルズ数（ $Re \gg 1$ ）の時は pinch 効果により管軸から0.6R（R：管半径）に移動することから粒子の硬さによる挙動の違いを示した。そこでAFMを用いて、血小板、人工血小板（rGPIa/IIa-AMS）、AMS、赤血球のバネ定数およびヤング率を原子間力顕微鏡（AFM）を用いて測定し、粒子の弾性と流動分布の関連性について調べる。

また、血小板は血流の中で血管損傷部位に粘着、凝集するが、このような血栓形成過程においてこの粘着の強さが重要となる。最終的に粘着力こそ止血能に関わってくると考えられる。そこで本研究では血小板および人工血小板と内皮下組織の主成分であるcollagen との粘着力、また、それぞれの凝集塊とcollagen との粘着力をAFMにより測定を行い、人工血小板の粘着能の評価を行った。

**B. 研究方法**

**B-1. 試料の調整**

**(1) 人工血小板（rGPIa/IIa-AMS, AMS）**

人工血小板には早稲田大学理工学部の武岡らが作製したrGPIa/IIa-AMS, AMSを用いた。作製方法としてはリコンビナントアルブミン溶液からpHと温度の制御によりアルブミンオリゴマー体を作り、分子内・分子間ジスルフィド結合によりアルブミンマイクロスフィア（AMS）を得、N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) を介してrGPIa/IIaをAMSに結合させた。粒径は約300 $\mu$ mから3 $\mu$ mぐらいまで作製可能である。本

研究ではあらかじめ FITC (励起波長: 495nm, 蛍光波長: 520nm) で蛍光標識された粒径 1-2 $\mu$ m の粒子を用いた。

### (2) 血小板及び赤血球懸濁液

ヒト新鮮血 9ml に 3.8wt% クエン酸三ナトリウム 1ml を加え, 1000rpm で 10 分間室温において遠心分離を行い, 上澄みを血小板多血漿 (PRP), 沈降したものを赤血球懸濁液として調製した。

### (3) 実験試料の作製

それぞれの Dish にそれぞれの懸濁液 100 $\mu$ l, PBS 2ml を混入し, 1 時間 4 $^{\circ}$ C で放置した。その後 PBS で 3-4 回洗浄し, PBS に浸して AFM で液中測定を行った。そして, 試料のバネ定数およびヤング率を算出した。

### B-2 バネ定数の求め方

バネ定数は原子間力顕微鏡における試料のフォースカーブを取得し, フォースカーブの傾きからフックの法則を用いて算出した。カンチレバーの先端に付いている探針を試料に近づけると試料と探針が接しカンチレバーは上方に変位する。これを縦軸に, カンチレバーの降下量を横軸にプロットし, フォースカーブを描く。最初, カンチレバーは試料と離れており, カンチレバーを降下させてもカンチレバーはたわまないためフォースカーブは水平となる。試料とカンチレバーが接した後, カンチレバーをさらに降下させると, カンチレバーは上方向にたわむためフォースカーブは右上がりの線を描く。

試料が金属のように硬ければ, 試料とカンチレバーが接しても試料がへこまないため, カンチレバーを降下させた分だけカンチレバーはたわむ。しかし, 試料が細胞のように柔らかければ, カンチレバーを降下させたとき細胞もへこむため, カンチレバーのたわみ量は少なくなり, フォースカーブの傾きは小さくなる。以上より, 試料の弾性はフォースカーブの傾きに表れる。

単純化して計算するために試料をフックの法則に従うバネとして考え, 下記の式にて試料の弾性をバネ定数 (K) として計算した。試料とカンチレバー先端の探針との作用点に働く力はカンチレバーのバネ定数 (k) とカンチレバーのたわみ量 (y) の積として求められる。また, 作用点に働く力は試料のバネ定数 (K) とカンチレバーの降下量 (x) からカンチレバーのたわみ量 (y) を差し引いた値との積に等しい。そして, フォースカーブの傾き

を t とすると  $t = y/x$  なので, 最終的に下記の式になった。

$$K(x-y) = ky$$

$$K = \frac{ky}{x-y} = \frac{k}{\frac{x}{y}-1} = \frac{0.09}{\frac{1}{t}-1} \quad (1)$$

k: カンチレバーのバネ定数 (0.09[N/m])

K: 試料のバネ定数

x: カンチレバーの降下量

y: カンチレバーのたわみ量

t: フォースカーブの傾き

カンチレバーのバネ定数 (k) は上述のように 0.09N/m と既知数であるため, フォースカーブより傾き (t) を求めることにより, 試料のバネ定数 (K) は計算される。

### B-3 弾性係数 (ヤング率) の求め方

ヤング率を算出するには Hertz の接触理論を用いた。Hertz の接触理論とは円弧等によって定義される形状をもつ物体間の弾性接触問題に良く用いられる理論であり, 本実験では無限に広がる平面と球との接触を考えた。

カンチレバーの先端, および粒子は弾性を持つ球体とみなし, カンチレバー先端および粒子の曲率半径を  $R_1$ ,  $R_2$ , ポアソン比を  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ , ヤング率を  $E_1$ ,  $E_2$  とすると等価曲率半径 R は

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \quad (2)$$

ここで  $R_1$  (カンチレバー先端の曲率半径) は 20[nm] であるのに対して,  $R_2$  (粒子の曲率半径) は数 $\cdot$ m であるので,  $R_1 \ll R_2$  となり

$$R = R_1 \quad (3)$$

また, 等価ヤング率 E は

$$\frac{1}{E} = \frac{1}{2} \left( \frac{1-\nu_1}{E_1} + \frac{1-\nu_2}{E_2} \right) \quad (4)$$

ここで  $\text{Si}_3\text{N}_4$  のヤング率  $E_1 = 150$ [GPa] である[42] ので,  $E_1 \gg E_2$  より

$$E = 2 \frac{E_2}{1-\nu_2} \quad (5)$$

また, この式において本研究ではポアソン比は

$v_2=0.5$  とした。

ここで、試料のへこみ量を  $z$ 、試料に与える力を  $F$  とすると、Hertz の接触理論より試料のへこみ量  $z$  は次の様に表すことができる。

$$z = \left( \frac{9}{4E^2R} \right)^{\frac{1}{3}} F^{\frac{2}{3}} \quad (6)$$

試料のへこみ量 ( $z$ ) はカンチレバーの降下量 ( $x$ ) とカンチレバーのたわみ量 ( $y$ ) との差なので

$$z = x - y \quad (7)$$

また、試料に与える力 ( $F$ ) はフックの法則よりカンチレバーのバネ定数 ( $k: 0.09[\text{N/m}]$ ) とカンチレバーのたわみ量 ( $y$ ) の積なので

$$F = ky \quad (8)$$

以上により (6) 式に (3), (5), (7), (8) 式を代入すると

$$E_2 = \frac{3(1-v_2) \cdot k}{4 R^{0.5}} \frac{y}{(x-y)^{1.5}} \quad (9)$$

よって、この式に既知の値を代入し、フォースカーブの解析結果を代入すると、試料のヤング率が算出される。

最終的に、一つのフォースカーブよりバネ定数およびヤング率が同時に算出することができる。

#### B-4 粘着力の測定法

##### (1) 洗浄血小板

ヒト新鮮血 9ml に対して 0.013M クエン酸三ナトリウム 1ml, 10units/ml apyrase を混合し, 12000rpm で 15 秒間遠心分離を行った。その上澄みを等溶の 2 価カチオン free HEPES-Tyrode buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5mM D-glucose) で置換し, 12000rpm で 15 秒間遠心分離を行い, これを 4 回繰り返した。次にその上澄みを HEPES-Tyrode buffer (上記の free HEPES-Tyrode buffer に 1.25mM  $\text{CaCl}_2$ , 6.25mg/ml BSA を加えたもの) で置換し, 1500rpm で 1 分間遠心分離を行い, その上澄みを PRP (血小板多血漿) とした。最終的に洗浄血小板は CFSE で蛍光標識してやることにより, 可視化が可能になった。

##### (2) 実験試料の作製

まず、個々の粒子の粘着力測定における試料の調整法を述べる。それぞれの Dish に AMS または rGPIa/IIa-AMS 100 $\mu$ l, PBS 2ml を混入し, 1 時間 4 $^{\circ}$ C

で放置した。また, Dish に PRP 100 $\mu$ l, PBS 2ml を混入し, 1 時間 4 $^{\circ}$ C で放置した。その後 PBS で 3-4 回洗浄し, PBS に浸して AFM で液中測定を行った。

凝集塊の粘着力測定においては AMS および rGPIa/IIa-AMS については同様である。血小板の凝集塊を作製する際には ADP を用いて, 血小板を活性化, 凝集させた。凝集に関する血漿蛋白質の影響を取り除く為に PRP から洗浄血小板を調整した。Dish に洗浄血小板 100 $\mu$ l, 1mg/ml ADP 1ml, PBS 1ml を混入し, 1 時間 4 $^{\circ}$ C で放置した。その後, 同様に測定した。

##### (3) カンチレバーの調製

カンチレバーへの修飾について述べる。カンチレバーには collagen をコーティングした時と, 何もコーティングしていない時の 2 種類を用いた。カンチレバーに collagen を修飾させる方法として 0.3mg/ml collagen type I (pH3 HCl) にカンチレバーを 24 時間 4 $^{\circ}$ C でインキュベートした。それを乾かした後, 用いた。collagen type I は血栓形成の足場となる内皮下組織に含まれており, そこに粘着する血小板および人工血小板の GPIa/IIa との粘着力を測定することができる。また, カンチレバーに何もコーティングしていない時には, カンチレバーの素材である  $\text{Si}_3\text{N}_4$  とそれぞれの粒子や凝集塊との粘着力を測定したことになる。

##### (4) 粘着力測定

粒子の弾性測定においてはカンチレバーを試料に押し付けた時のフォースカーブを解析したが, 粘着力測定ではカンチレバーを試料から引き離す時のフォースカーブを解析した。

解析方法としてフォースカーブより算出されたカンチレバーのたわみ量 ( $\delta$ ) と既知であるカンチレバーのバネ定数 ( $k: 0.09[\text{N/m}]$ ) からフックの法則を用いた。最終的に, 粘着力は次のように算出される。

$$F = k\delta \quad (10)$$

#### B-5 流動分布の測定方法

本実験において, 矩形管流路を共焦点レーザー走査型顕微鏡のステージ上に設置し, 測定を行った。灌流液全容量は 6.3ml であり, 流路上流及び下流にリザーバを設けることにより, その液面差によって流路内腔に流れを負荷した。流量から流れ方向の圧力勾配を求め, それを矩形管流路の理論式に代入し, 壁せん断速度を算出し, これを流

れのパラメータとした。

### (1) 矩形管流路

流路には血小板止血機能が重要な細動脈（径 15-500 $\mu\text{m}$ ）をモデルとした一辺約 200 $\mu\text{m}$  の矩形管流路を用いた。矩形管の作製方法は 2 枚のカバーガラス（厚 200 $\mu\text{m}$ ）を顕微鏡下において 200 $\mu\text{m}$  になるまで近づけ、200 $\mu\text{m}$  になったところで Upper Chamber 及び Lower Chamber（アクリル製）で固定した。但し、流路内腔はガラスである。矩形管流路内腔の全長は 10mm である。助走区間は 0.1mm 以下であり、矩形管入口から測定領域までに流れは十分に発達していると考えられる。

矩形管流路を用いることで管内を観察、測定を行う時に円管とは違い、屈折率等を考慮に入れなくても良くなり、高空間分解能で測定できるようになった。

また矩形管流路において管径方向に y 軸、高さ方向に z 軸を設定した。本実験における測定領域である  $z = 0$  においては円管流路内ポアズイユ流れに十分近似できることが分かっている。よって、細動脈モデルとして用いても、問題はない。また y 座標は矩形管の中心から壁面までの距離で規格し、 $y^*$ （管軸  $y^* = 0$ 、管壁  $y^* = 1$ ）とした。

### (2) 灌流液の調製

流路に流す灌流液には pH7.4 PBS を用い、AMS や洗浄血小板を懸濁させた時の流動分布を算出した。また、赤血球ゴーストを調製し、赤血球ゴーストを懸濁させた時の rGPIa/IIa-AMS の流動分布も算出した。せん断速度は約 400 $\text{s}^{-1}$  である。以下に赤血球ゴーストの調整法について述べる。

ヒト新鮮血 9ml に 3.8wt% クエン酸三ナトリウム 1ml を加え、3000rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄みの PRP を採取後保存し、buffy coat（白血球層）を取り除いた。沈降層を等張液 pH7.4 PBS で 2-3 回洗浄し、0 $^{\circ}\text{C}$  に冷却した低張液 pH7.4 PBS（1.2mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.35mM ATP 含有）に混入し、赤血球を溶血させた。0 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間放置し、その後 45 分間 37 $^{\circ}\text{C}$  に保ち、赤血球の膜を閉じさせた。13000rpm、4 $^{\circ}\text{C}$  で 4 分間遠心分離を行い、低張液 pH7.4 PBS を用いて 2-3 回洗浄後、赤血球ゴーストが存在する沈降層を取り出し、高張液 1.6M 生理食塩水で浸透圧を調製した。その後、等張液 pH7.4 PBS（1% glucose 含有）で洗浄し、12 時間 4 $^{\circ}\text{C}$  に保った。13000rpm、4 $^{\circ}\text{C}$  で遠心分離を行い、沈降層を保存しておいた PRP に懸濁させ、2 時間 4 $^{\circ}\text{C}$  に保った。15000rpm で 20 分間遠心分離を行い、上層の赤血球ゴースト懸濁液を採取した。最終的にこの懸濁液を等張液 pH7.4 PBS（1% glucose 含

有）によって赤血球ゴーストを調製した。

### (3) 画像処理

取得した蛍光画像は画像処理ソフトウェアである NIH-image（U.S. National Institute of Health 製）を用いて画像処理し、粒子の抽出を行った。その手順としては取得した画像のコントラストを上げ、粒子の輪郭を抽出し、二値化してバックグラウンドを除去した。この様にして得られた粒子像から粒子の重心位置及び粒子の大きさ（ピクセル数）を算出した。取得した連続画像を全て重ね合わせ、その平均を取ると、流路内腔部分は明るく、壁面部分は暗くなるので、これを二値化することによって、壁面の座標を算出した。

### (4) 流動分布算出

画像処理によって全ての画像（200 枚）から粒子が抽出され、その重心位置が求められる。そこで粒子を壁面からの距離に応じて分類し、その個数分布を流動分布とした。実験において、蛍光画像は一度に管軸から管壁まで全体を取得できないので、可視化領域を管径方向に移動させ画像を取得し、それらを貼り合わせた。

## C. 研究結果

### C-1. 粒子の弾性

#### (1) 粒子のバネ定数及びヤング率

血小板、rGPIa/IIa-AMS、AMS、赤血球ゴースト（RBC Ghost）および赤血球（RBC）のバネ定数の測定結果を図 1 に示す。

バネ定数は rGPIa/IIa-AMS、AMS、血小板、赤血球ゴースト、赤血球の順で大きい値が得られた。粒子が Dish に確実にコーティングされているかどうかであるが、FITC で蛍光標識された AMS を

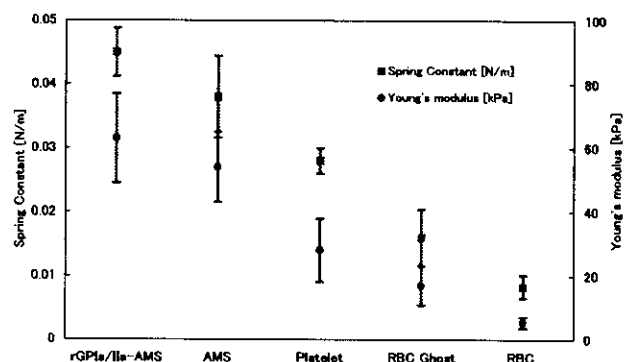


図 1. 血小板、人工血小板、赤血球の弾性係数

バネ定数は rGPIa/IIa-AMS、AMS、血小板、赤血



球ゴースト、赤血球の順で大きい値が得られた。粒子が Dish に確実にコーティングされているかどうかであるが、FITCで蛍光標識されたAMSを蛍光顕微鏡で観察したところ、Dish表面に存在するのが確認された。これは、血小板およびrGPIa/IIa-AMSでも同様である。また、この実験においてはrGPIa/IIa-AMS、AMSは粒径1-2 $\mu$ mの粒子を用いた。粒子の弾性には粒径はそれほど影響を与えないと考え、粒径1-2 $\mu$ mの粒子のバネ定数をその粒子のバネ定数と考えた。これはヤング率においても同様である。

バネ定数はカンチレバーのバネ定数や試料に与える力によって大きく値が異なるので一概にこれとは言えない。また、フォースカーブを解析する際に、一般にフォースカーブは直線ではなく曲線であり、曲線のどこの傾きを取るかによってバネ定数も変化する。しかし、これを考慮に入れたうえでバネ定数を算出したところ、値がカンチレバーと同じオーダーで出たので実験そのものは成功したと言える。

また、同様の粒子においてヤング率を算出したところ、結果は図1の様になった。ヤング率もバネ定数と同様の測定結果が得られた。Leeらは血小板のヤング率は5-50[kPa]であると報告している。一方、本研究では $28 \pm 9.8$ [kPa]と算出されたので、本実験は妥当だと言える。以上により、バネ定数およびヤング率測定から粒子の硬さはrGPIa/IIa-AMS、AMS、血小板、赤血球ゴースト、赤血球の順で硬いという結果になった。

rGPIa/IIa-AMSがAMSより硬いという結果は、rGPIa/IIaをAMSに固相化したことが原因であると考えられる。rGPIa/IIaを固相化すれば何故、硬くなるかの具体的なメカニズムは分からないが、rGPIa/IIa自体が比較的硬い、rGPIa/IIaを固相化したことによる膜の変性等が原因として推測される。

次に血小板と赤血球の比較をしてみると、血小板の方が硬いという結果が得られた。赤血球の変形能に影響を与える因子としてまず、細胞表面積対体積比がある。赤血球形態は静止状態で中くばみの円盤形をしている。もし血小板の様に球状なら、ある容積に対して最小の表面積となるため、膜変形が起こるためには膜がのび、表面積が増加する必要がある。しかし、可逆的な赤血球変形では膜表面積は不変であるため、結局、球状赤血球の変形は起こらない。この様に膜表面積と赤血球容積は変形能に大きな影響を与え、細胞表面積対体積比が大きいほど変形は容易である。この事から血小板の方が硬いと言える。

また、内容物についても赤血球変形能に与える因子が存在する。赤血球の円盤形維持には、細胞内のナトリウム、カリウム、カルシウムイオン、ATP濃度との関連が深いことが指摘されている。そして、赤血球の形が細胞内のATP濃度に依存して、円盤から平滑球となることをNakaoらが明らかにした。具体的には細胞内ATP濃度が正常値の50%以下になると形は変化し、10%になると平滑球になり、変形能が下がると報告した。また、内容物の粘度、主にヘモグロビン濃度も変形能に影響を与える。ヘモグロビン濃度が増加すると、細胞内部の流動性の低下(特に赤血球外液粘度/内部粘度の増加)を引き起こし、赤血球変形能の低下をもたらすとKonらは報告した。この様にATP濃度やヘモグロビン濃度が変形能に影響を与える。また、赤血球の膜や内部にはヘモグロビンによって酸素は存在しているが、酸素分圧を正常値より下げていくと、30mmHg以下では赤血球は著しく硬くなるという報告があった。これらを考慮すると赤血球の変形能に酸素分圧も重要であることが分かる。

一方、血小板の内容物はミトコンドリア、ゴルジ装置、ライソゾーム、グリコゲン粒子などであり、血小板に特徴的なものとしては細胞膜がスポンジ状に入り組んだ開放小管系(OCS)、 $\alpha$ 顆粒、濃染顆粒(DG)、暗調小管系(DTS)などの小器官である。この様に血小板の中味は比較的詰まっているので、内部粘度は高く、細胞内部の流動性も低くなり、血小板は赤血球に比べて変形しにくいと考えられる。

次に赤血球ゴーストと赤血球の比較をしてみると、赤血球ゴーストの方が硬いという結果が得られた。赤血球を溶血させても赤血球ゴーストは、ほぼ元の形に戻り、膜表面の化学組成の変化はほとんど無い。このことから弾性の違いはその内容物に依るものだと考えられる。本実験においては赤血球を溶血させる際にATPもヘモグロビンと共に膜外に放出され、作製された赤血球ゴーストの中にはPBSが詰まり、膜中のATPレベルが低下したと考えられる。上述の様にATP濃度差が弾性に影響を及ぼしたと考えられる。ゴーストを作製する際に用いる低張液(PBS)にATPは含まれているが、結果的にその量が少なかったと考えられ、ATPやカルシウムイオン濃度をうまく調節してやることで弾性を維持できるであろう。

## (2) 流動分布との相互関係

血小板およびAMSの流動分布を図2に示し

た。流動分布のグラフの横軸は矩形管の中心から壁面までの距離で規格したものであり、 $y^*$  (管軸  $y^*=0$ , 管壁  $y^*=1$ ) とした。また、縦軸は全粒子数に対する粒子数の割合である。実験条件として、赤血球ゴーストは非混在下であり、せん断速度は  $380s^{-1}$  である。粒子の弾性と流動分布の関係を調べる為に赤血球ゴーストは懸濁しなかった。

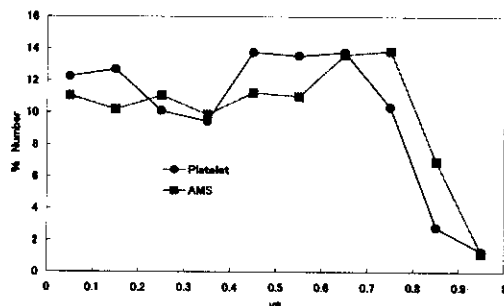


図2. 血小板と人工血小板の濃度分布

結果として、血小板よりも AMS の流動分布のピーク値が壁近傍に寄った。また、図1より AMSの方が血小板よりも硬いという結果が得られている。流れに影響する因子として粒子の形状、粒径および弾性が考えられる。しかし、血小板および AMS は共に球状であり、粒径もほぼ同じ ( $1.5\text{-}5\mu\text{m}$ ) の粒子を解析したので、図2の流動分布の違いは硬さの違いに依存していると考えられる。これらを考慮すると、粒子が硬いほどその平衡位置は壁近傍に寄ると考えられる。また、人工血小板は AMS とほぼ同じ弾性なので AMS と同様の挙動を示すと考えられるが、追加実験の必要がある。

この実験においてせん断速度を低くした理由は GPIIb/IIIa は低せん断速度において collagen と粘着するが、高せん断速度 (約  $800s^{-1}$ ) では collagen に粘着しないからである。つまり、この人工血小板は低せん断速度の時の挙動が重要であるからである。しかし、もちろん高せん断速度の時も重要であり、その挙動を調べるのは今後の課題である。また、赤血球ゴーストを混在させた時の挙動も重要であると考えられる。

### (3) 人工血小板の挙動

人工血小板の流動分布を図3に示した。実験条件として、赤血球ゴーストは混在下であり、せん断速度は  $400s^{-1}$  である。このせん断速度を用いた

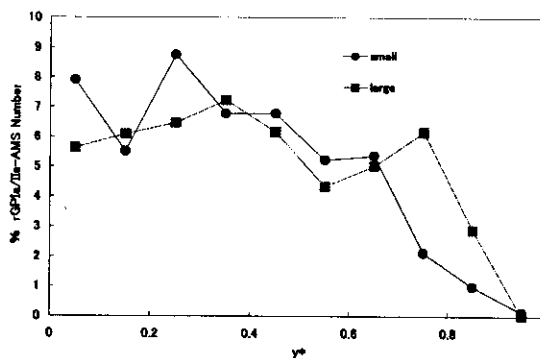


図3. 人工血小板の濃度分布

のは上述の通りである。また、赤血球ではなく赤血球ゴーストを用いたのはヘモグロビンによって人工血小板の蛍光観察が出来ないからである。図3には粒子の大きさを分けて (small:  $1.5\mu\text{m}$  以下 large:  $3.0\mu\text{m}$  以上) 流動分布を示した。粒子全体の流動分布を見ると壁近傍には、ほとんど粒子は存在しなかった。しかし、粒径で流動分布を分けると粒径が大きい粒子は小さい粒子に比べて、壁近傍に寄っていた。このことから、粒径が大きい方が人工血小板としては有効であると考えられる。血管径を考慮すると、あまり大きい粒子だと血管を塞いでしまうので、人工血小板の粒径は数  $\mu\text{m}$  が妥当だと考えられる。

しかしながら、人工血小板の挙動は本研究においてだけでは分からないことが多い。人工血小板がどのように collagen に粘着し、凝集塊を形成するのは分かっていない。それを解明するにはまず、壁 (カバーガラス) を collagen コーティングし、人工血小板および赤血球ゴーストを懸濁し、人工血小板の挙動を時間変化において観察する必要があると考えられる。また、赤血球ゴーストがうまく作製されているかについては、血小板と赤血球ゴーストを懸濁させた時の血小板の流動分布を算出し、従来研究と比較すれば良いと考えられる。

## C-2. 粘着力測定

### (1) 血小板の粘着力

図4に血小板、rGPIIb/IIIa-AMS、AMS 個々の粒子の粘着力測定の結果を示した。同様に血小板、rGPIIb/IIIa-AMS、AMS の凝集塊の粘着力測定を行ったところ、結果は図5のようになった。カンチレバーに collagen が十分にコーティングされているかどうかを調べるために、何もコーティングしていないカンチレバーを用いて同様に粘着力測

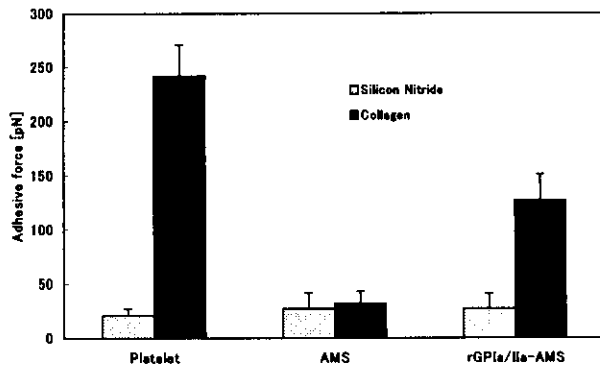


図4. 粒子の粘着力

定をしたところ、図4および図5から collagen は確実にカンチレバーに修飾されていることが確認された。また、この実験において、凝集塊の粘着力を測定したが、その凝集塊は顕微鏡下で約  $400\mu\text{m}^2$  であった。

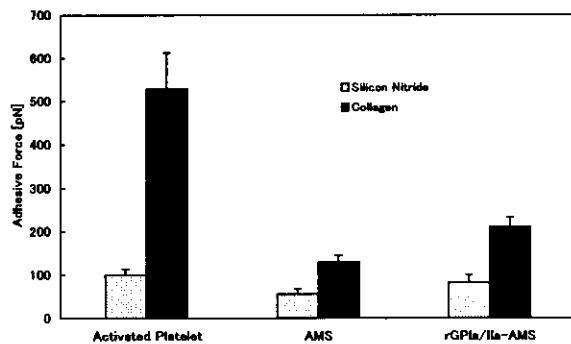


図5. 凝集塊の粘着力

まず、血小板の粘着力について考察する。個々の血小板と collagen との粘着力は  $242\pm 29[\text{pN}]$  であった。Holland らは vWF や fibrinogen などの血漿蛋白質に存在する RGD ペプチド (Arg-Gly-Asp) というアミノ酸配列と GPIIb/IIIa との粘着力を測定し、 $660\pm 0.45[\text{pN}]$  と算出した。この結果と比較すると、collagen-GPIa/IIa (GPIV 他) の粘着力は RGD ペプチド-GPIIb/IIIa の粘着力に比べて低いことが分かった。これは低せんだん速度では collagen に直接粘着するが、高せんだん速度では vWF を介してでない、血小板は collagen にほとんど粘着しないということから理解することが出来る。一方、GPIIb/IIIa は血小板血栓形成に深く関わっている、collagen-GPIa/IIa の粘着力より高いと考えられる。

#### D. 考察

血小板と人工血小板 (rGPIa/IIa-AMS) との粘着力の比較をしてみると、個々の粒子の粘着力は  $\text{Si}_3\text{N}_4$  tip の時の値はそれぞれ  $21\pm 6.4[\text{pN}]$ ,  $27\pm 14[\text{pN}]$  となり差は無いが、collagen tip の時の値は  $242\pm 29[\text{pN}]$ ,  $127\pm 24[\text{pN}]$  となり約 2 倍の差が出た。また、同様に凝集塊の粘着力においても  $\text{Si}_3\text{N}_4$  tip の時の値はそれぞれ  $100\pm 14[\text{pN}]$ ,  $82\pm 18[\text{pN}]$  とほとんど差はないが、collagen tip の時の値は  $530\pm 83[\text{pN}]$ ,  $210\pm 23[\text{pN}]$  と約 2.5 倍の開きが出た。この結果から人工血小板の粘着能は低いと考えられる。血小板には collagen のレセプターとして GPIa/IIa 以外にも GPIV や GPVI 等が存在するので、血小板の方が人工血小板より粘着力が高いのも当然かもしれない。また、生理的条件下において collagen 表面は正電荷、血小板膜は負電荷を持つ。最終的に粘着は、GPIa/IIa-collagen というレセプター・リガンドの相互関係によって生じるが、この静電気力が粘着力に影響を及ぼしていると考えられる。しかし、これらを考慮に入れたとしても人工血小板の粘着力が低いと考えられる。人工血小板の改善の余地としてまず、人工血小板に固相化する rGPIa/IIa の量を増やすことが挙げられる。また、collagen への粘着のみを考える場合、人工血小板表面の負電荷を増加させてやることによって、collagen への粘着力も増加すると考えられる。

本研究においては血栓形成の足場となる内皮下組織 (collagen) と血小板や人工血小板との粘着のモデルを考えた。そして、個々の粒子の粘着力と凝集塊の粘着力を測定したが、凝集塊の粘着力測定は一つの粒子の粘着力と、その粒子の周りの粒子への粘着力を測定したと言える。というのも、カンチレバー先端の曲率半径は  $20\text{nm}$  であるのに対して、個々の粒子の曲率半径は  $150\text{nm}\text{--}2\mu\text{m}$  であり、幾ら粒子を凝集させても、最終的にはカンチレバーは一つの粒子を突付いているはずだからである。

また、AMS および rGPIa/IIa-AMS の粒径の違いによる粘着力測定の結果から粘着力は粒径によって変化しないことが分かった。粘着力を測定する際、カンチレバーが接触する面積は粒径の大小によらず、ほぼ一定であることが粘着力の変化しない理由として挙げられる。また、AMS および rGPIa/IIa-AMS を作製した武岡らによると、大きな粒子は小さな粒子の融合体であると報告があったので、AMS の物性は変わらないはずである。この事も理由として挙げられる。この結果と粒径が

大きくなるにつれて表面積も大きくなるという事を踏まえると、個々の粒子において、粒径が大きい方が粘着力は大きいということが言える。つまり、人工血小板としては粒径が大きい方がcollagenへの粘着において有効である。しかし、人工血小板同士は多少、凝集するのであまり粒径が大きいと、血管内に血栓が生じる危険性があるので粒径は数 $\mu\text{m}$ が妥当であると考えられる。

#### E. 結論

AFMを用いてcollagen-GPIa/IIaというligand-receptor間の粘着力を定量化することができた。人工血小板の評価としては担体に接着させるrGPIa/IIaの量を増やし、ある程度の大きさの担体を用いた方が良いという結果になった。そして、同様の方法を用いれば、血小板粘着において重要なGPIb-vWF等の粘着力も測定でき、更に人工血小板の評価ができると考えられる。また、人工血小板の担体であるliposomeとAMSとの比較もできるであろう。

#### F. 健康危険情報

本研究では、in vitro実験を中心に人工血小板の流動特性、凝集特性を測定し、臨床応用に向けての基礎的な評価が中心であるため、健康に関する危険情報を提供することは出来ない。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 (投稿準備中)

2. 学会発表

(1) Tanishita, K., Deguchi, T., Tsuji, T., Nishida, T., Ikeda, Y., Motion of artificial platelet in the model small artery, ICTAM 2000, p.98.

(2) 出口隆明、辻徹也、西谷孝子、池田康夫、谷下一夫、人工血小板の運動の計測、第12回バイオエンジニアリング講演会講演論文集、(2000)pp.193-194.

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし